

03/20/00
3662 U.S. PTO

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

REQUEST FOR FILING APPLICATION

Under Rule 53(a), (b) & (f)

(No Filing Fee or Oath/Declaration)

(Do NOT use for Provisional or PCT Applications)

Use for Design or Utility Applications

**PATENT
APPLICATION**

RULE 53(f) NO DECLARATION

Assistant Commissioner of Patents

Atty. Dkt.

PM 258100

PAT/Dr.Fe-kö

990228BT

and Trademarks

Washington, DC 20231

M#

Client Ref

Date:

March 20, 2000

Sir:

1. This is a Request for filing a new Patent Application(☐ Design ☒ Utility) entitled:

2. (Complete) Title: **NEUE FÜR DAS TAL-GEN CODIERENDE NUKLEOTIDSEQUENZEN**

without a filing fee or Oath/Declaration but for which is enclosed the following:

3. ☒ Abstract 1 page(s).

4. 41 Pages of Specification (only spec. and claims); 5. ☒ Specification in non-English language

6. 16 Numbered claim(s); and

7. ☒ 1 sheet(s) per set: ☐ 1 set informal; 8. ☒ formal of size: ☒ A4 ☐ 11"

9. **DOMESTIC/INTERNATIONAL** priority is claimed under 35 USC 119(e)/120/365(c) based on the following provisional, nonprovisional and/or PCT international application(s):

Application No.	Filing Date	Application No.	Filing Date
(1) 60/142,915	July 9, 1999	(2)	
(3)		(4)	
(5)		(6)	

10. **FOREIGN** priority is claimed under 35 USC 119(a)-(d)/365(b) based on filing in

Application No.	Filing Date	Application No.	Filing Date
(1)		(2)	
(3)		(4)	
(5)		(6)	

11. (No.) Certified copy (copies): ☐ attached; ☐ previously filed (date) _____
in U.S. Application No. 1 filed on _____

12. ☐ This is a reissue of Patent No. _____

13. ☐ See top first page re prior Provisional, National, International application(s) (X box only if info is there and do not complete corresponding item 14 or 15.)

14. ☐ **Amend the specification** by inserting before the first line -- This is a ☐ Continuation-in-Part
☐ Divisional ☐ Continuation ☐ Substitute Application (MPEP 201.09) of:

14(a) ☐ National Appln. No. 1 filed .- - (M#)

14(b) ☐ International Appln. No. PCT/ filed which designated the U.S. --

15. ☐ **Amend the specification** by inserting before the first line: --This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/ , filed --

16. Extension to date: ☐ concurrently filed ☐ not needed ☐ previously filed

17. ☐ Prior application is assigned to

by Assignment recorded _____ Reel _____ Frame _____

18. ☐ Attached:

19. This application is made by the following named inventor(s) (Double check instructions for accuracy.):

(1) Inventor	L.	K.	DUNICAN (Deceased)
	First	Middle Initial	Family Name
Residence	Galway	Ireland	Ireland
	City	State/Foreign Country	Country of Citizenship
Post Office Address	Oranswell Road, Bushy Park, Galway, County Galway, Ireland		
(include Zip Code)			

(2) Inventor	Ashling		MCCORMACK
	First	Middle Initial	Family Name
Residence	Athlone	Ireland	Ireland
	City	State/Foreign Country	Country of Citizenship
Post Office Address	Moate Road, Athlone, County Westmeath, Ireland		
(include Zip Code)			

(3) Inventor	Cliona		STAPELTON
	First	Middle Initial	Family Name
Residence	Roscrea	Ireland	Ireland
	City	State/Foreign Country	Country of Citizenship
Post Office Address	27, Railway View, Roscrea, County Tipperary, Ireland		
(include Zip Code)			

(4) Inventor	Kevin		BURKE
	First	Middle Initial	Family Name
Residence	Galway	Ireland	Ireland
	City	State/Foreign Country	Country of Citizenship
Post Office Address	5, Greenfield Road, Newcastle, Galway, County Galway, Ireland		
(include Zip Code)			

(5) Inventor	Bettina		MÖCKEL
	First	Middle Initial	Family Name
Residence	Bielefeld	Germany	Germany
	City	State/Foreign Country	Country of Citizenship
Post Office Address	Mittelstrasse 15, Bielefeld, Germany		
(include Zip Code)	D-33602		

20. NOTE: FOR ADDITIONAL INVENTORS, check box ☐ and attach sheet with same information regarding additional inventors.

**Pillsbury Madison & Sutro LLP
Intellectual Property Group**

1100 New York Avenue, NW.
Ninth Floor
Washington, DC 20005-3918
Tel: (202) 861-3000
Atty/Sec: ASH/nmw

By: Atty: Ann S. Hobbs

Reg. No. 36830

Sig:



Fax: (202) 822-0944

Tel: (202) 861-3063

NOTE: File in duplicate with 2 post card receipts (PAT-103) & attachments

[illegible]

Neue für das tal-Gen codierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das tal-Gen kodierende Nukleotidsequenzen und Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin und L-Tryptophan unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen das tal-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, insbesondere aber in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie z. B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z. B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch z. B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z. B. das Lysin-Analogon S-(2-Aminoethyl)-Cystein oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren wie z. B. L-Lysin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung Aminosäure

produzierender Stämme von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht. Übersichtsartikel hierzu findet man unter anderem bei

- 5 Kinoshita ("Glutamic Acid Bacteria", in: *Biology of Industrial Microorganisms*, Demain and Solomon (Eds.), Benjamin Cummings, London, UK, 1985, 115-142), Hilliger (*BioTec* 2, 40-44 (1991)), Eggeling (*Amino Acids* 6:261-272 (1994)), Jetten und Sinskey (*Critical Reviews in Biotechnology* 15, 73-103 (1995)) und Sahm et al. (*Annals of the New York Academy of Science* 782, 25-39 (1996)).

- Die Bedeutung des Pentosephosphat-Zyklus' für die Biosynthese und Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, durch coryneforme Bakterien ist Gegenstand
- 15 zahlreicher Bemühungen der Fachwelt.

- So berichten Oishi und Aida (*Agricultural and Biological Chemistry* 29, 83-89 (1965)) über den „hexosemonophosphate shunt“ von *Brevibacterium ammoniagenes*. Sugimoto und Shio (*Agricultural and Biological Chemistry* 51, 101-108 (1987))
- 20 berichten über die Regulation der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase in *Brevibacterium flavum*.

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin und L-Tryptophan bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin, in der pharmazeutischen Industrie und insbesondere in der Tierernährung Anwendung. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran, neue verbesserte Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Base, sondern auch die Salze wie z. B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit den Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 5 (i) eine Nukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 3 oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
- 10 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

- 15 ein Polynukleotid gemäß Anspruch 4, enthaltend eine der Nukleotidsequenzen wie in SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 3 dargestellt,

ein Polynukleotid gemäß Anspruch 5, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID NO. 2 und SEQ ID NO. 4 dargestellt, enthält

- 20 ein Vektor, enthaltend das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, und als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten.

- 25 Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID NO. 1 oder SEQ ID NO. 3 enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID NO. 1 oder

SEQ ID NO. 3 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um
5 cDNA in voller Länge zu isolieren, die für die Transaldolase codieren und solche cDNA oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des Transaldolase-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin
10 geeignet als Primer zur Herstellung von DNA von Genen, die für die Transaldolase codieren, durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz
15 besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

20 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine,
25 die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 ein, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Transaldolase und
30 auch solche, die zu wenigstens 70 % identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders die zu wenigstens 90 % bis

DocId:32866363

95 % Identität mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-
5 Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin und L-Tryptophan unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits eine Aminosäure produzieren, und in denen die für das tal-Gen codierenden Nukleotidsequenzen, verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

10 Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken
15 Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin,
20 aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art
25 Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum, sind die zum Beispiel
30 bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

- 5 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Lysin produzierende Mutanten bzw.
Stämme, wie beispielsweise

- 10 Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709
Brevibacterium flavum FERM-P 1708
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 und
Corynebacterium glutamicum DSM5715
Corynebacterium glutamicum DM58-1
15 Corynebacterium glutamicum DSM12866.

und daraus hergestellte L-Threonin produzierende Mutanten
bzw. Stämme, wie beispielsweise

- 20 Corynebacterium glutamicum ATCC21649
Brevibacterium flavum BB69
Brevibacterium flavum DSM5399
Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 269
Brevibacterium lactofermentum TBB-10

und daraus hergestellte L-Isoleucin produzierende Mutanten
bzw. Stämme, wie beispielsweise

- 25 Corynebacterium glutamicum ATCC 14309
Corynebacterium glutamicum ATCC 14310
Corynebacterium glutamicum ATCC 14311
Corynebacterium glutamicum ATCC 15168
Corynebacterium ammoniagenes ATCC 6871

- 30 und daraus hergestellte L-Tryptophan produzierende Mutanten
bzw. Stämme, wie beispielsweise

Corynebacterium glutamicum ATCC21850 und
Corynebacterium glutamicum KY9218(pKW9901)

Den Erfindern gelang es, das neue, für die Transaldolase
(EC 2.2.1.2) kodierende tal-Gen von C. glutamicum zu
5 isolieren.

Zur Isolierung des tal-Gens oder auch anderer Gene von C.
glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses
Mikroorganismus in E. coli angelegt. Das Anlegen von
Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und
10 Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das...
Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in
die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland,
1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular
Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory
15 Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die
des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell
50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et
al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996)
beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die
20 mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987,
Proceedings of the National Academy of Sciences USA,
84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al.,
1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.
Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326
25 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum
ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und
Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). O'Donohue (The Cloning
and Molecular Analysis of Four Common Aromatic Amino Acid
Biosynthetic Genes from Corynebacterium glutamicum. Ph.D.
30 Thesis, National University of Ireland, Galway, 1997)
beschreibt die Klonierung von C. glutamicum Genen unter
Verwendung des von Short et al. (Nucleic Acids Research,
16: 7583) beschriebenen λ Zap Expressionssystems. Zur
Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli
35 können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences,

25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z. B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) dem FASTA-Algorithmus von Pearson und Lipman (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 85,2444-2448 (1988)) oder dem BLAST-Algorithmus von Altschul et al. (Nature Genetics 6, 119-129 (1994)) untersucht und mit den in öffentlich zugänglichen Datenbanken vorhandenen Sequenzeinträgen verglichen werden. Öffentlich zugängliche Datenbanken für Nukleotidsequenzen sind beispielsweise die der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland) oder die des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA).

Gegenstand der Erfindung ist die neue DNA-Sequenz aus C.glutamicum, die den für das tal-Gen kodierenden DNA-Abschnitt enthält, dargestellt als SEQ ID NO 1 und SEQ ID NO 3. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet.

In SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 4 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des Tal-Genproduktes dargestellt.

Eine auf die oben beschriebene Art und Weise hergestellte Genbank kann weiterhin durch Hybridisierung mit

- 5 Nukleotidsonden bekannter Sequenz wie beispielsweise des zwf-Gens (JP-A-09224661) untersucht werden. Die klonierte DNA der Klonen, die eine positive Reaktion bei der Hybridisierung zeigen, wird wiederum sequenziert und man erhält zum einen die bekannte Nukleotidsequenz der
10 eingesetzten Sonde und zum anderen die benachbart liegenden neuen DNA-Sequenzen.

- Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 3 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind
15 DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 3 oder Teilen von oder SEQ ID NO 3 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z. B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in
20 Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d. h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen
25 oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der
30 Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

- In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit oder SEQ ID
35 NO 3 oder Teilen von oder SEQ ID NO 3 hybridisieren,

Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus oder SEQ ID NO 3 ergeben.

5 Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter

10 Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

15 findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Die Erfinder fanden heraus, daß coryneforme Bakterien nach

20 Überexpression des tal-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die

25 Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im

30 Verlaufe der fermentativen L-Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die

35 Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit

unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht

5 werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns
10 et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of
15 Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides
20 (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Beispielhaft wurde das erfindungsgemäße tal-Gen mit Hilfe von Plasmiden überexprimiert.

Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen
25 Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den
30 kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z. B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet
35 werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des *hom-thrB*-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR@Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Ein Beispiel für einen Plasmidvektor mit dessen Hilfe das Verfahren Amplifikation durch Integration durchgeführt werden kann ist pSUZ1, der in Figur 1 dargestellt ist. Plasmid pSUZ1 besteht aus dem von Spratt et al. (Gene 41:

337-342(1986))beschriebenem E. coli Vektor pBGS8 in den das tal-Gen eingebaut wurde.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, vorteilhaft sein, neben dem tal-Gen eines oder mehrere
5 Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Pentosephosphatweges oder des Aminosäure-Exports zu verstärken oder zu überexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung L-Aminosäuren, insbesondere von L-Lysin, gleichzeitig eines oder mehrere
10 der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende dapA-Gen (EP-B 0 197 335),
- das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende lysC-Gen (Kalinowski et al. (1990), Molecular
15 and General Genetics 224: 317-324),
- das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Pyruvat Carboxylase codierende pyc-Gen (DE-A-
20 198 31 609),
- das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- das für die Transketolase kodierende tkt-Gen (Accession
25 number AB023377 der Datenbank der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland)),
- das für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase kodierende gnd-Gen (JP-A-9-224662),
- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende
30 zwf-Gen (JP-A-9-224661),

- das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen (DE-A-195 48 222),
- das zwal-Gen (DE 199 59 328.0; DSM 13115),
- das für die Enolase kodierende eno-Gen (DE: 19947791.4),
- 5 • das devB-Gen,
- das opcA-Gen (DSM 13264)

verstärkt, bevorzugt überexprimiert werden.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Threonin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus
10 der Gruppe

- gleichzeitig das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende hom-Gen (Peoples et al., Molecular Microbiology 2, 63-72 (1988)) oder das für eine "feed back resistente" Homoserin-Dehydrogenase kodierende
15 hom^{dr}-Allel (Archer et al., Gene 107, 53-59 (1991)),
- das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Pyruvat Carboxylase codierende pyc-Gen (DE-A-
20 198 31 609),
- das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- das für die Transketolase kodierende tkt-Gen (Accession
25 number AB023377 der Datenbank der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland)),

- das für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase kodierende gnd-Gen (JP-A-9-224662),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende zwf-Gen (JP-A-9-224661),
- 5 • das für den Threonin-Export kodierende thrE-Gen (DE 199 41 478.5; DSM 12840),
- das zwal-Gen (DE 199 59 328.0; DSM 13115),
- das für die Enolase kodierende eno-Gen (DE: 19947791.4),
- das devB-Gen,
- 10 • das opcA-Gen (DSM 13264)

verstärkt, bevorzugt überexprimiert werden..

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des tal-Gens gleichzeitig

- 15 • das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase codierende pck-Gen (DE 199 50 409.1 DSM 13047) und/oder
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende pgi-Gen (US 09/396,478, DSM 12969), oder
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen
- 20 (DE 199 51 975.7; DSM 13114), oder
- das zwa2-Gen (DE: 199 59 327.2; DSM 13113)

abzuschwächen.

- Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des tal-Gens
- 25 unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in:

Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren
5 (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel
10 (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den
15 Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und
20 Kohlehydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und
25 organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser,
30 Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure,
35 Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder

die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle
5 Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise
10 während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur
15 Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen
20 aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-
25 Aminosäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et
30 al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Folgender Mikroorganismus wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- *Escherichia coli* JM109/pSUZ1 als DSM 13263.

In SEQ ID NO 1 ist ebenfalls das neue devB-Gen enthalten.
Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen
Herstellung von Aminosäuren.

COSECO

Folgende Figuren sind beigelegt:

Figur 1: Karte des Plasmids pSUZ1

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

- | | | |
|----|----------|---|
| 5 | lacZ: | segments of lacZ α gene fragment |
| | kan r: | kanamycin resistance |
| | tal: | transaldolase gene |
| | ori: | origin of replication of plasmid pBGS8 |
| | BclI: | cut site of restriction enzyme BclI |
| 10 | EcoRI: | cut site of restriction enzyme EcoRI |
| | HindIII: | cut site of restriction enzyme HindIII |
| | PstI: | cut site of restriction enzyme PstI |
| | SacI: | cut site of restriction enzyme SacI |

Examples

The following examples will further illustrate this invention. The molecular biology techniques, e.g. plasmid DNA isolation, restriction enzyme treatment, ligations, standard transformations of Escherichia coli etc. used are, (unless stated otherwise), described by Sambrook et al., (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratories, USA).

10 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCosI (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCosI Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der

Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 170870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt. Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des tal-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 270913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany). Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning

- Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den
- 5 Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde
- 10 anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 μ g/ml Zeocin ausplattiert.
- 15 Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467)
- 20 mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und
- 25 Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).
- 30 Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte
- 35 Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:3389-3402), gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID NO 1 und SEQ ID NO 3 dargestellt.

Example 3

10 Cloning of the tal gene

PCR was used to amplify DNA fragments containing the entire tal gene of *C. glutamicum* 13032 and flanking upstream and downstream regions. PCR reactions were carried out using oligonucleotide primers designed from the sequence as determined in examples 1 and 2. Genomic DNA was isolated from *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 according to Heery and Dunican (Applied and Environmental Microbiology 59: 791-799 (1993)) and used as template. The tal primers used were:

20 fwd. primer: 5' GGT ACA AAG GGT CTT AAG 3'C
rev. primer: 5' GAT TTC ATG TCG CCG TTA 3'

PCR Parameters were as follows:

35 cycles
95°C for 3 minutes
25 94°C for 1 minute
47°C for 1 minute
72°C for 45 seconds
2.0 mM MgCl₂
approximately 150-200 ng DNA template.

30 The PCR product obtained was cloned into the commercially available pGEM-T vector purchased from Promega Corp. (pGEM-

T Easy Vector System 1, cat. no. A1360, Promega UK, Southampton, UK) using strain E. coli JM109 (Yanisch-Perron et al., Gene, 33: 103-119 (1985)) as a host. The entire tal gene was subsequently isolated from the pGEM T-vector on an
5 Eco RI fragment and cloned into the lacZ α EcoRI site of the E. coli vector pBGS8 (Spratt et al., Gene 41(2-3): 337-342 (1986)). The restriction enzymes used were obtained from Boehringer Mannheim UK Ltd. (Bell Lane, Lewes East Sussex
10 BN7 1LG, UK) and used according to manufacturers instructions. E. coli JMI09 was then transformed with this ligation mixture and electrotransformants were selected on Luria agar supplemented with isopropyl-thiogalactopyranoside (IPTG), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-galactopyranoside (XGAL) and kanamycin at concentrations of
15 1mM, 0.02% and 50 mg/l respectively. Plates were incubated for twelve hours at 37°C. Plasmid DNA was isolated from one transformant, characterised by restriction enzyme analysis using Eco RI. This new construct was designated pSUZ 1.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> National University of Ireland, Galway
 Degussa-Hüls AG
 5 <120> Neue für das tal Gen codierende Nukleotidsequenzen
 <130> 990228BT
 10 <140>
 <141>
 <160> 4
 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 6995
 <212> DNA
 20 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <221> CDS
 <222> (2471)..(3550)
 25 <223> tal-Gen
 <400> 1
 cacatttgaa ccacagttgg ttataaaatg gggttcaacat cactatgggt agaggtgttg 60
 30 acgggtcaga ttaagcaaag actactttcg gggtagatca cctttgccaa atttgaacca 120
 attaacctaa gtcgtagatc tgatcatcgg atctaacgaa aacgaaccaa aactttggtc 180
 ccggtttaac ccaggaagga ttgaccacct tgacgctgtc acctgaactt caggcgctca 240
 35 ctgtacgcaa ttaccctct gattgggtccg atgtggacac caaggctgta gacactgttc 300
 gtgtcctcgc tgcagacgct gtagaaaact gtgggtccgg ccaccaggc accgcaatga 360
 40 gcctgggtcc ccttgcatac accttgtacc agcgggttat gaacgtagat ccacaggaca 420
 ccaactgggc aggccgtgac cgcttcgttc tttcttgtgg cactcctct ttgaccagt 480
 acatccagct ttacttgggt ggattcggcc ttgagatgga tgacctgaag gctctgcgca 540
 45 cctgggattc cttgaccca ggacaccctg agtaccgcca caccaagggc gttgagatca 600
 ccaactggccc tcttggccag ggtcttgcac ctgcagttgg tatggccatg gctgctcgtc 660
 50 gtgagcgtgg cctattcgac ccaaccgctg ctgagggcga atccccattc gaccaccaca 720
 tctacgtcat tgcttctgat ggtgacctgc aggaagggtg cacctctgag gcatcctcca 780
 tcgctggcac ccagcagctg ggcaacctca tcgtgttctg ggatgacaac cgcatctcca 840
 55 tcgaagacaa cactgagatc gctttcaacg aggacgttgt tgctcgttac aaggcttacg 900
 gctggcagac cattgaggtt gaggctggcg aggacgttgc agcaatcgaa gctgcagtgg 960

ctgaggctaa gaaggacacc aagcgacctt ccttcatccg cgttcgcacc atcatcggtct 1020
 tcccagctcc aactatgatg aacaccggtg ctgtgcacgg tgctgctctt ggcgcagctg 1080
 5 aggttgcagc aaccaagact gagcttggat tcgatcctga ggctcacttc gcgatcgacg 1140
 atgaggttat cgctcacacc cgctccctcg cagagcgcg cgcacagaag aaggctgcat 1200
 10 ggcaggtcaa gtctgatgag tgggcagctg ccaacctga gaacaaggct ctgttcgatc 1260
 gcctgaactc ccgtgagctt ccagcgggct acgctgacga gctcccaaca tgggatgcag 1320
 atgagaaggg cgctgcaact cgtaaggctt ccgaggctgc acttcaggca ctgggcaaga 1380
 15 cccttcctga gctgtggggc ggttccgctg acctcgcagg ttccaacaac accgtgatca 1440
 agggctcccc ttcttcggc cctgagtcca tctccaccga gacctggtct gctgagcctt 1500
 20 acggccgtaa cctgcacttc ggtatccgtg agcacgctat gggatccatc ctcaacggca 1560
 tttccctcca cggtggcacc cgccatacg gcggaacctt cctcatcttc tccgactaca 1620
 tgcgtcctgc agttcgtctt gcagctctca tggagaccga cgcttactac gtctggaccc 1680
 25 acgactccat cggtctgggc gaagatggcc caaccacca gcctgttgaa accttggtctg 1740
 cactgcgcgc catcccaggt ctgtccgtcc tgcgtcctgc agatgcgaac gagaccgccc 1800
 aggcttgggc tgcagcactt gagtacaagg aaggccctaa gggctttgca ctgaccgccc 1860
 30 agaacgttcc tgttctggaa ggcaccaagg agaaggctgc tgaaggcggtt cgccgcggtg 1920
 gctacgtcct ggttgagggt tccaaggaaa cccagatgt gatcctcatg ggctccggct 1980
 35 ccgaggttca gcttgcagtt aacgctgcga aggctctgga agctgagggc gttgcagctc 2040
 gcgttgtttc cgttccttgc atggattggt tccaggagca ggacgcagag tacatcgagt 2100
 40 ccgttctgcc tgcagctgtg accgctcgtg tgtctgttga agctggcatc gcaatgcctt 2160
 ggtaccgctt cttgggcacc cagggccgtg ctgtctccct tgagcacttc ggtgcttctg 2220
 cggattacca gacctgttt gagaagttcg gcatcaccac cgatgcagtc gtggcagcgg 2280
 45 ccaaggactc cattaacggt taattgccct gctgttttta gcttcaaccc ggggcaatat 2340
 gattctccgg aattttattg ccccggttg ttgttgtaa tcggtacaaa ggtcttaag 2400
 50 cacatccctt acttgctgc tctccttgag cacagttcaa gaacaattct ttaaggaaa 2460
 atttagtttc atg tct cac att gat gat ctt gca cag ctc ggc act tcc 2509
 Met Ser His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser
 1 5 10
 55 act tgg ctc gac gac ctc tcc cgc gag cgc att act tcc ggc aat ctc 2557
 Thr Trp Leu Asp Asp Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu
 15 20 25

	agc cag gtt att gag gaa aag tct gta gtc ggt gtc acc acc aac cca	2605
	Ser Gln Val Ile Glu Glu Lys Ser Val Val Gly Val Thr Thr Asn Pro	
	30 35 40 45	
5	gct att ttc gca gca gca atg tcc aag ggc gat tcc tac gac gct cag	2653
	Ala Ile Phe Ala Ala Ala Met Ser Lys Gly Asp Ser Tyr Asp Ala Gln	
	50 55 60	
10	atc gca gag ctc aag gcc gct ggc gca tct gtt gac cag gct gtt tac	2701
	Ile Ala Glu Leu Lys Ala Ala Gly Ala Ser Val Asp Gln Ala Val Tyr	
	65 70 75	
15	gcc atg agc atc gac gac gtt cgc aat gct tgt gat ctg ttc acc ggc	2749
	Ala Met Ser Ile Asp Asp Val Arg Asn Ala Cys Asp Leu Phe Thr Gly	
	80 85 90	
20	atc ttc gag tcc tcc aac ggc tac gac ggc cgc gtg tcc atc gag gtt	2797
	Ile Phe Glu Ser Ser Asn Gly Tyr Asp Gly Arg Val Ser Ile Glu Val	
	95 100 105	
	gac cca cgt atc tct gct gac cgc gac gca acc ctg gct cag gcc aag	2845
	Asp Pro Arg Ile Ser Ala Asp Arg Asp Ala Thr Leu Ala Gln Ala Lys	
	110 115 120 125	
25	gag ctg tgg gca aag gtt gat cgt cca aac gtc atg atc aag atc cct	2893
	Glu Leu Trp Ala Lys Val Asp Arg Pro Asn Val Met Ile Lys Ile Pro	
	130 135 140	
30	gca acc cca ggt tct ttg cca gca atc acc gac gct ttg gct gag ggc	2941
	Ala Thr Pro Gly Ser Leu Pro Ala Ile Thr Asp Ala Leu Ala Glu Gly	
	145 150 155	
35	atc agc gtt aac gtc acc ttg atc ttc tcc gtt gct cgc tac cgc gag	2989
	Ile Ser Val Asn Val Thr Leu Ile Phe Ser Val Ala Arg Tyr Arg Glu	
	160 165 170	
40	gtc atc gct gcg ttc atc gag ggc atc aag cag gct gct gca aac ggc	3037
	Val Ile Ala Ala Phe Ile Glu Gly Ile Lys Gln Ala Ala Ala Asn Gly	
	175 180 185	
	cac gac gtc tcc aag atc cac tct gtg gct tcc ttc ttc gtc tcc cgc	3085
	His Asp Val Ser Lys Ile His Ser Val Ala Ser Phe Phe Val Ser Arg	
	190 195 200 205	
45	gtc gac gtt gag atc gac aag cgc ctc gag gca atc gga tcc gat gag	3133
	Val Asp Val Glu Ile Asp Lys Arg Leu Glu Ala Ile Gly Ser Asp Glu	
	210 215 220	
50	gct ttg gct ctg cgc ggc aag gca ggc gtt gcc aac gct cag cgc gct	3181
	Ala Leu Ala Leu Arg Gly Lys Ala Gly Val Ala Asn Ala Gln Arg Ala	
	225 230 235	
55	tac gct gtg tac aag gag ctt ttc gac gcc gcc gag ctg cct gaa ggt	3229
	Tyr Ala Val Tyr Lys Glu Leu Phe Asp Ala Ala Glu Leu Pro Glu Gly	
	240 245 250	
	gcc aac act cag cgc cca ctg tgg gca tcc acc ggc gtg aag aac cct	3277
	Ala Asn Thr Gln Arg Pro Leu Trp Ala Ser Thr Gly Val Lys Asn Pro	
	255 260 265	

5 gcg tac gct gca act ctt tac gtt tcc gag ctg gct ggt cca aac acc 3325
 Ala Tyr Ala Ala Thr Leu Tyr Val Ser Glu Leu Ala Gly Pro Asn Thr
 270 275 280 285

gtc aac acc atg cca gaa ggc acc atc gac gcg gtt ctg gag cag ggc 3373
 Val Asn Thr Met Pro Glu Gly Thr Ile Asp Ala Val Leu Glu Gln Gly
 290 295 300

10 aac ctg cac ggt gac acc ctg tcc aac tcc gcg gca gaa gct gac gct 3421
 Asn Leu His Gly Asp Thr Leu Ser Asn Ser Ala Ala Glu Ala Asp Ala
 305 310 315

15 gtg ttc tcc cag ctt gag gct ctg ggc gtt gac ttg gca gat gtc ttc 3469
 Val Phe Ser Gln Leu Glu Ala Leu Gly Val Asp Leu Ala Asp Val Phe
 320 325 330

20 cag gtc ctg gag acc gag ggt gtg gac aag ttc gtt gct tct tgg agc 3517
 Gln Val Leu Glu Thr Glu Gly Val Asp Lys Phe Val Ala Ser Trp Ser
 335 340 345

25 gaa ctg ctt gag tcc atg gaa gct cgc ctg aag tagaatcagc acgctgcac 3570
 Glu Leu Leu Glu Ser Met Glu Ala Arg Leu Lys
 350 355 360

agtaacggcg acatgaaatc gaattagttc gatcttatgt ggccggttaca catctttcat 3630
 taaagaaagg atcgtgacac taccatcgtg agcacaaaca cgacccctc cagctggaca 3690

30 aaccactgc gcgaccgca ggataaacga ctccccgca tcgctggccc ttccggcatg 3750
 gtgatcttcg gtgtcactgg cgacttggct cgaaagaagc tgctccccgc catttatgat 3810

35 ctagcaaacc gcggattgct gccccagga ttctcgttgg taggttacgg ccgccgcgaa 3870
 tgggtccaaag aagactttga aaaatacgtc cgcgatgccg caagtgtctg tgctcgtacg 3930
 gaattccgtg aaaatgtttg ggagcgctc gccgagggtg tggaatttgt tcgcggcaac 3990

40 tttgatgatg atgcagcttt cgacaacctc gctgcaacac tcaagcgcac cgacaaaacc 4050
 cgcggcaccg ccggcaactg ggcttactac ctgtccattc caccagattc cttcacagcg 4110

45 gtctgccacc agctggagcg ttccggcatg gctgaatcca ccgaagaagc atggcgccgc 4170
 gtgatcatcg agaagccttt cggccacaac ctcgaaatccg cacacgagct caaccagctg 4230
 gtcaacgcag tcttcccaga atcttctgtg ttccgcatcg accactatctt gggcaaggaa 4290

50 acagttcaaa acatcctggc tctgcgtttt gctaaccagc tgtttgagcc actgtggaac 4350
 tccaactacg ttgaccacgt ccagatcacc atgggtgaag atattggctt ggggtggacgt 4410

55 gctggttact acgacggcat cggcgagcc cgcgacgtca tccagaacca cctgatccag 4470
 ctcttggtc tggttgccat ggaagaacca atttcttctg tgccagcgca gctgcaggca 4530
 gaaaagatca aggtgctctc tgcgacaaag ccgtgctacc cattggataa aacctccgct 4590

cgtgggtcagt acgctgcccgg ttggcagggc tctgagttag tcaagggact tcgcaagaa 4650
 gatggcttca accctgagtc caccactgag acttttgcgg cttgtacctt agagatcacg 4710
 5 tctcgtcgtt gggctgggtg gccgttctac ctgcgcaccg gtaagcgtct tggctgcctg 4770
 gttactgaga ttgccgtggg gtttaaagac gcaccacacc agcctttcga cggcgacatg 4830
 10 actgtatccc ttggccaaaa cgccatcgtg attcgcgtgc agcctgatga aggtgtgctc 4890
 atccgcttcg gttccaaggt tccaggttct gccatggaag tccgtgacgt caacatggac 4950
 ttctcctact cagaatcctt cactgaagaa tcacctgaag catacgagcg cctcattttg 5010
 15 gatgcgctgt tagatgaatc cagcctcttc cctaccaacg aggaagtggg actgagctgg 5070
 aagattctgg atccaattct tgaagcatgg gatgccgatg gagaaccaga ggattaccca 5130
 20 gcgggtacgt ggggtccaaa gagcgctgat gaaatgcttt cccgcaacgg tcacacctgg 5190
 cgcaggccat aatttagggg caaaaaatga tctttgaact tccgatacc accaccacgc 5250
 aaatttcaa gaccctaact cgactgcgtg aatcgggcac ccaggtcacc accggccgag 5310
 25 tgctcacctt catcgtggtc actgactccg aaagcgatgt cgctgcagtt accgagtgca 5370
 ccaatgaagc ctgcgcgag caccatctc gcgtgatcat tttggtggtt ggcgataaaa 5430
 30 ctgcagaaaa caaagttgac gcagaagtcc gtatcgggtg cgacgctggg gcttccgaga 5490
 tgatcatcat gcatctcaac ggacctgtcg ctgacaagct ccagtatgtc gtcacaccac 5550
 tgttgcttcc tgacaccccc atcgttgctt ggtggccagg tgaatcacca aagaatcctt 5610
 35 ccaggaccc aattggacgc atgcacaac gacgcatac tgatgctttg tacgaccgtg 5670
 atgacgcact agaagatcgt gttgagaact atcaccagg tgataccgac atgacgtggg 5730
 cgcgccctac ccagtggcgg ggacttggtg cctcctcatt ggatcaccca ccacacagcg 5790
 40 aaatcacttc cgtgaggctg accggtgcaa gcggcagtac ctcggtggat ttggctgcag 5850
 gctggttggc gcggaggctg aaagtgcctg tgatccgcga ggtgacagat gctcccaccg 5910
 45 tgccaaccga tgagtttggg actccactgc tggctatoca gcgcctggag atcgttcgca 5970
 ccaccggctc gatcatcatc accatctatg acgctcatac ccttcaggta gagatgccgg 6030
 50 aatccggcaa tgccccatcg ctggtggcta ttggctcgtc aagtgagtc gactgcttgt 6090
 ctgaggagct tcgccacatg gatccagatt tgggctacca gcacgacta tccggcttgt 6150
 ccagcgtcaa gctggaacc gtctaaggag aaatacaaca ctatggttga tgtagtacgc 6210
 55 gcacgcgata ctgaagattt ggttgacag gctgcctcca aattcattga ggttggtgaa 6270
 gcagcaactg ccaataatgg caccgcacag gtagtgctca ccggtgggtg gcgccgcatc 6330
 aagttgctgg aaaagctcag cgttgatgcg gctgaccttg cctgggatcg cattcatgtg 6390

	ttcttcggcg	atgagcgcaa	tgtccctgtc	agtgattctg	agtccaatga	gggccaggct	6450
5	cgtgaggcac	tgttgtccaa	ggtttctatc	cctgaagcca	acattcacgg	atatgggtctc	6510
	ggcgacgtag	atcttgca	ggcagcccg	gcttacgaag	ctgtgttgga	tgaattcgca	6570
	ccaaacggct	ttgatcttca	cctgctcggc	atgggtggcg	aaggccatat	caactccctg	6630
10	ttccctcaca	ccgatgcagt	caaggaatcc	tccgcaaagg	tcatcgcggt	gtttgattcc	6690
	cctaagcctc	cttcagagcg	tgcaactcta	acccttctctg	cggttcactc	cgcaaagcgc	6750
15	gtgtggttgc	tggtttctgg	tgcggagaag	gctgaggcag	ctgcggcgat	cgtcaacggg	6810
	gagcctgctg	ttgagtggcc	tgctgctgga	gctaccggat	ctgaggaaac	ggattgttc	6870
	ttggctgatg	atgctgcagg	aaatctctaa	gcagcgccag	ctctaacaag	aagctttaac	6930
20	aagaagctct	aacgaaaagc	actaacaaac	taatccgggt	gcgaaccttc	atctgaatcg	6990
	atgga						6995

```

25  <210> 2
    <211> 360
    <212> PRT
    <213> Corynebacterium glutamicum

```

30 <400> 2
Met Ser His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser Thr Trp Leu
 1 5 10 15

Asp Asp Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu Ser Gln Val
35 20 25 30

Ile Glu Glu Lys Ser Val Val Gly Val Thr Thr Asn Pro Ala Ile Phe
35 40 45

40 Ala Ala Ala Met Ser Lys Gly Asp Ser Tyr Asp Ala Gln Ile Ala Glu
50 55 60

Leu Lys Ala Ala Gly Ala Ser Val Asp Gln Ala Val Tyr Ala Met Ser
65 70 75 80

Ile Asp Asp Val Arg Asn Ala Cys Asp Leu Phe Thr Gly Ile Phe Glu
85 90 95

Ser Ser Asn Gly Tyr Asp Gly Arg Val Ser Ile Glu Val Asp Pro Arg
50 100 105 110

Ile Ser Ala Asp Arg Asp Ala Thr Leu Ala Gln Ala Lys Glu Leu Trp
115 120 125

55 Ala Lys Val Asp Arg Pro Asn Val Met Ile Lys Ile Pro Ala Thr Pro
130 135 140

Gly Ser Leu Pro Ala Ile Thr Asp Ala Leu Ala Glu Gly Ile Ser Val
145 150 155 160

```

      Asn Val Thr Leu Ile Phe Ser Val Ala Arg Tyr Arg Glu Val Ile Ala
                        165                        170                        175
5    Ala Phe Ile Glu Gly Ile Lys Gln Ala Ala Ala Asn Gly His Asp Val
                        180                        185                        190

      Ser Lys Ile His Ser Val Ala Ser Phe Phe Val Ser Arg Val Asp Val
                        195                        200                        205
10   Glu Ile Asp Lys Arg Leu Glu Ala Ile Gly Ser Asp Glu Ala Leu Ala
                        210                        215                        220

      Leu Arg Gly Lys Ala Gly Val Ala Asn Ala Gln Arg Ala Tyr Ala Val
15   225                        230                        235                        240

      Tyr Lys Glu Leu Phe Asp Ala Ala Glu Leu Pro Glu Gly Ala Asn Thr
                        245                        250                        255
20   Gln Arg Pro Leu Trp Ala Ser Thr Gly Val Lys Asn Pro Ala Tyr Ala
                        260                        265                        270

      Ala Thr Leu Tyr Val Ser Glu Leu Ala Gly Pro Asn Thr Val Asn Thr
                        275                        280                        285
25   Met Pro Glu Gly Thr Ile Asp Ala Val Leu Glu Gln Gly Asn Leu His
                        290                        295                        300

      Gly Asp Thr Leu Ser Asn Ser Ala Ala Glu Ala Asp Ala Val Phe Ser
30   305                        310                        315                        320

      Gln Leu Glu Ala Leu Gly Val Asp Leu Ala Asp Val Phe Gln Val Leu
                        325                        330                        335

35   Glu Thr Glu Gly Val Asp Lys Phe Val Ala Ser Trp Ser Glu Leu Leu
                        340                        345                        350

      Glu Ser Met Glu Ala Arg Leu Lys
                        355                        360
40

<210> 3
<211> 1083
45 <212> DNA
    <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> CDS
50 <222> (1)..(1080)
    <223> tal

<400> 3
55 atg tct cac att gat gat ctt gca cag ctc ggc act tcc act tgg ctc 48
    Met Ser His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser Thr Trp Leu
      1          5          10          15

```

	gac gac ctc tcc cgc gag cgc att act tcc ggc aat ctc agc cag gtt	96
	Asp Asp Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu Ser Gln Val	
	20 25 30	
5	att gag gaa aag tct gta gtc ggt gtc acc acc aac cca gct att ttc	144
	Ile Glu Glu Lys Ser Val Val Gly Val Thr Thr Asn Pro Ala Ile Phe	
	35 40 45	
10	gca gca gca atg tcc aag ggc gat tcc tac gac gct cag atc gca gag	192
	Ala Ala Ala Met Ser Lys Gly Asp Ser Tyr Asp Ala Gln Ile Ala Glu	
	50 55 60	
15	ctc aag gcc gct ggc gca tct gtt gac cag gct gtt tac gcc atg agc	240
	Leu Lys Ala Ala Gly Ala Ser Val Asp Gln Ala Val Tyr Ala Met Ser	
	65 70 75 80	
20	atc gac gac gtt cgc aat gct tgt gat ctg ttc acc ggc atc ttc gag	288
	Ile Asp Asp Val Arg Asn Ala Cys Asp Leu Phe Thr Gly Ile Phe Glu	
	85 90 95	
25	tcc tcc aac ggc tac gac ggc cgc gtg tcc atc gag gtt gac cca cgt	336
	Ser Ser Asn Gly Tyr Asp Gly Arg Val Ser Ile Glu Val Asp Pro Arg	
	100 105 110	
30	atc tct gct gac cgc gac gca acc ctg gct cag gcc aag gag ctg tgg	384
	Ile Ser Ala Asp Arg Asp Ala Thr Leu Ala Gln Ala Lys Glu Leu Trp	
	115 120 125	
35	gca aag gtt gat cgt cca aac gtc atg atc aag atc cct gca acc cca	432
	Ala Lys Val Asp Arg Pro Asn Val Met Ile Lys Ile Pro Ala Thr Pro	
	130 135 140	
40	ggt tct ttg cca gca atc acc gac gct ttg gct gag ggc atc agc gtt	480
	Gly Ser Leu Pro Ala Ile Thr Asp Ala Leu Ala Glu Gly Ile Ser Val	
	145 150 155 160	
45	aac gtc acc ttg atc ttc tcc gtt gct cgc tac cgc gag gtc atc gct	528
	Asn Val Thr Leu Ile Phe Ser Val Ala Arg Tyr Arg Glu Val Ile Ala	
	165 170 175	
50	gag atc gac aag cgc ctc gag gca atc gga tcc gat gag gct ttg gct	672
	Glu Ile Asp Lys Arg Leu Glu Ala Ile Gly Ser Asp Glu Ala Leu Ala	
	210 215 220	
55	ctg cgc ggc aag gca ggc gtt gcc aac gct cag cgc gct tac gct gtg	720
	Leu Arg Gly Lys Ala Gly Val Ala Asn Ala Gln Arg Ala Tyr Ala Val	
	225 230 235 240	
60	tac aag gag ctt ttc gac gcc gcc gag ctg cct gaa ggt gcc aac act	768
	Tyr Lys Glu Leu Phe Asp Ala Ala Glu Leu Pro Glu Gly Ala Asn Thr	
	245 250 255	

5 cag cgc cca ctg tgg gca tcc acc ggc gtg aag aac cct gcg tac gct 816
 Gln Arg Pro Leu Trp Ala Ser Thr Gly Val Lys Asn Pro Ala Tyr Ala
 260 265 270
 10 gca act ctt tac gtt tcc gag ctg gct ggt cca aac acc gtc aac acc 864
 Ala Thr Leu Tyr Val Ser Glu Leu Ala Gly Pro Asn Thr Val Asn Thr
 275 280 285
 15 atg cca gaa ggc acc atc gac gcg gtt ctg gag cag ggc aac ctg cac 912
 Met Pro Glu Gly Thr Ile Asp Ala Val Leu Glu Gln Gly Asn Leu His
 290 295 300
 20 ggt gac acc ctg tcc aac tcc gcg gca gaa gct gac gct gtg ttc tcc 960
 Gly Asp Thr Leu Ser Asn Ser Ala Ala Glu Ala Asp Ala Val Phe Ser
 305 310 315 320
 25 cag ctt gag gct ctg ggc gtt gac ttg gca gat gtc ttc cag gtc ctg -- 1008
 Gln Leu Glu Ala Leu Gly Val Asp Leu Ala Asp Val Phe Gln Val Leu
 325 330 335
 30 gag acc gag ggt gtg gac aag ttc gtt gct tct tgg agc gaa ctg ctt 1056
 Glu Thr Glu Gly Val Asp Lys Phe Val Ala Ser Trp Ser Glu Leu Leu
 340 345 350
 35 gag tcc atg gaa gct cgc ctg aag tag 1083
 Glu Ser Met Glu Ala Arg Leu Lys
 355 360
 40 <210> 4
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 45 <400> 4
 Met Ser His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser Thr Trp Leu
 1 5 10 15
 50 Asp Asp Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu Ser Gln Val
 20 25 30
 Ile Glu Glu Lys Ser Val Val Gly Val Thr Thr Asn Pro Ala Ile Phe
 35 40 45
 55 Ala Ala Ala Met Ser Lys Gly Asp Ser Tyr Asp Ala Gln Ile Ala Glu
 50 55 60
 Leu Lys Ala Ala Gly Ala Ser Val Asp Gln Ala Val Tyr Ala Met Ser
 65 70 75 80
 Ile Asp Asp Val Arg Asn Ala Cys Asp Leu Phe Thr Gly Ile Phe Glu
 85 90 95
 60 Ser Ser Asn Gly Tyr Asp Gly Arg Val Ser Ile Glu Val Asp Pro Arg
 100 105 110
 Ile Ser Ala Asp Arg Asp Ala Thr Leu Ala Gln Ala Lys Glu Leu Trp
 115 120 125

Ala Lys Val Asp Arg Pro Asn Val Met Ile Lys Ile Pro Ala Thr Pro
 130 135 140

5 Gly Ser Leu Pro Ala Ile Thr Asp Ala Leu Ala Glu Gly Ile Ser Val
 145 150 155 160

Asn Val Thr Leu Ile Phe Ser Val Ala Arg Tyr Arg Glu Val Ile Ala
 165 170 175

10 Ala Phe Ile Glu Gly Ile Lys Gln Ala Ala Asn Gly His Asp Val
 180 185 190

Ser Lys Ile His Ser Val Ala Ser Phe Phe Val Ser Arg Val Asp Val
 195 200 205

15 Glu Ile Asp Lys Arg Leu Glu Ala Ile Gly Ser Asp Glu Ala Leu Ala
 210 215 220

20 Leu Arg Gly Lys Ala Gly Val Ala Asn Ala Gln Arg Ala Tyr Ala Val
 225 230 235 240

Tyr Lys Glu Leu Phe Asp Ala Ala Glu Leu Pro Glu Gly Ala Asn Thr
 245 250 255

25 Gln Arg Pro Leu Trp Ala Ser Thr Gly Val Lys Asn Pro Ala Tyr Ala
 260 265 270

30 Ala Thr Leu Tyr Val Ser Glu Leu Ala Gly Pro Asn Thr Val Asn Thr
 275 280 285

Met Pro Glu Gly Thr Ile Asp Ala Val Leu Glu Gln Gly Asn Leu His
 290 295 300

35 Gly Asp Thr Leu Ser Asn Ser Ala Ala Glu Ala Asp Ala Val Phe Ser
 305 310 315 320

Gln Leu Glu Ala Leu Gly Val Asp Leu Ala Asp Val Phe Gln Val Leu
 325 330 335

40 Glu Thr Glu Gly Val Asp Lys Phe Val Ala Ser Trp Ser Glu Leu Leu
 340 345 350

45 Glu Ser Met Glu Ala Arg Leu Lys
 355 360

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterienk,
enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus
5 der Gruppe
- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid
codiert, das die Aminosäuresequenzen von
SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens
70 % identisch ist mit den Aminosäuresequenzen von
SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der
Polynukleotidsequenzen von a), b) oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1,
20 wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien
replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist, die
zusätzlich zumindest eine der Nukleotidsequenzen
enthält, die für die Gene tkt, zwf, opcA und devB
codieren.
- 25 3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1,
wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2,
enthaltend eine der Nukleinsäuresequenz, wie in
SEQ ID NO. 3 dargestellt.
- 30 5. Polynukleotid gemäß Anspruch 2,
das für ein Polypeptid codiert, das die

Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID NO. 2 und SEQ ID NO. 4 dargestellt, enthält.

6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2 enthaltend

(i) eine Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID NO. 3 dargestellt, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die den Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zur den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

7. Als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.

8. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:

a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen man zumindest das tal-Gen und gegebenenfalls eines oder mehrere der Gene tkt-Gen, zwf-Gen, devB-Gen oder opcA-Gen gleichzeitig verstärkt,

b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und

c) Isolieren der gewünschten L-Aminosäure.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

10. Verfahren gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Bakterien einsetzt, in denen die
Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet
5 sind, die die Bildung des der gewünschten L-Aminosäure
verringern.
11. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 8
bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß man coryneforme Bakterien verwendet, die eine der
Aminosäuren aus der Gruppe L-Lysin, L-Threonin, D-
Isoleucin oder L-Tryptophan herstellen.
12. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, gemäß Anspruch 8,
15 dadurch gekennzeichnet,
daß man in den coryneformen Mikroorganismen, die
insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren,
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
aus der Gruppe
- 20 12.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende dapA-Gen,
- 12.2 das für eine feed back resistente
Aspartatkinase kodierende lysC-Gen,
- 12.3 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat
25 Dehydrogenase kodierende gap-Gen,
- 12.4 das für die Pyruvat-Carboxylase
kodierende pyc-Gen,
- 12.5 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase
kodierende mqo-Gen,
- 30 12.6 das für die Transketolase kodierende tkt-Gen,

- 12.7 das für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
kodierende gnd-Gen,
- 12.8 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
kodierende zwf-Gen,
- 5 12.9 das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen,
- 12.10 das zwf1-Gen,
- 12.11 das für die Enolase kodierende eno-Gen,
- 12.12 das opcA-Gen
- verstärkt bzw. überexprimiert.
- 10 13. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin
gemäß Anspruch 8,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß man in coryneformen Mikroorganismen, die
insbesondere bereits L-Threonin produzieren,
15 gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
aus der Gruppe
- 13.1 gleichzeitig das für die Homoserin-Dehydrogenase
kodierende hom-Gen oder das für eine "feed back
resistente" Homoserin-Dehydrogenase kodierende
20 hom^{dr}-Allel,
- 13.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat
Dehydrogenase kodierende gap-Gen,
- 13.3 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende pyc-
Gen,
- 25 13.4 das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase
kodierende mqo-Gen,
- 13.5 das für die Transketolase kodierende tkt-Gen,

- 13.6 das für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
kodierende gnd-Gen,
- 13.7 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
kodierende zwf-Gen,
- 5 13.8 das für den Threonin-Export kodierende thrE-Gen,
- 13.9 das zwal-Gen,
- 13.10 das für die Enolase kodierende eno-Gen,
- 13.11 das opcA-Gen
- verstärkt, insbesondere überexprimiert.
- 10 14. Verfahren gemäß Anspruch 10,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man für die Herstellung von L-Aminosäuren,
insbesondere von L-Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin oder
L-Tryptophan Bakterien fermentiert, in denen man
15 gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
aus der Gruppe,
- 14.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
codierende pck-Gen
- 14.2 das für die Glucose-6-Phosphat6 Isomerase
20 codierende pgi-Gen
- 14.3 das für die Pyruvat-Oxidase codierende poxB-Gen
oder
- 14.4 das zwa2-Gen
- abschwächt.
- 25 15. Verwendung von Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1
als Hybridisierungs sonden zur Isolation von cDNA, die
für das tal-Genprodukt codiert.

16. Verwendung von Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1 als Hybridisierungssonden zur Isolierung von cDNA oder Genen, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des tal-Gens aufweisen.

Neue für das tal-Gen codierende Nukleotidsequenzen

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterienk, enthaltend eine

5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4 enthält,

10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit den Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO. 4

15 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenzen von a), b) oder c)

20 und ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen man zumindest das tal-Gen verstärkt,
- 25 b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.

Figur 1:

